

## Exploración estructural de perfiles de actividad antibacteriana y hemolítica de análogos no naturales del péptido antimicrobiano Mastoparén MP-8

Luisa Fernanda Carreño<sup>1,2</sup>, José Manuel Lozano<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

<sup>2</sup> Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), carrera 50 No. 26-20, Bogotá, D. C., Colombia.

\* Correos electrónicos: [jmlozanom@unal.edu.co](mailto:jmlozanom@unal.edu.co), [jm\\_lozano@fidic.org.co](mailto:jm_lozano@fidic.org.co).

Recibido para evaluación: 2 de enero de 2013.

Aceptado para publicación: 17 de abril de 2013.

### RESUMEN

En este trabajo se reporta el efecto, la modificación puntual y sistemática a nivel del enlace peptídico realizada al péptido Mastoparén MP-8, obteniéndose 27 pseudopéptidos en total. Los resultados permitieron determinar que los pseudopéptidos  $\psi$ -38617(INLKALAALAK<sup>d</sup>-[CH<sub>2</sub>NH]-RLL),  $\psi$ -38629(INLKA<sup>d</sup>-[CH<sub>2</sub>NH]-LAALAKRLL) y  $\psi$ -38630(INLK-[CH<sub>2</sub>NH]-ALAALAKRLL) presentan mejor actividad que el péptido Mastoparén MP-8 frente a las bacterias Gram negativas y conservaron la actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram positivas; además, la modificación realizada produjo tres moléculas que abolieron totalmente la actividad hemolítica propia del péptido nativo. Todas las modificaciones realizadas a esta secuencia provocaron un aumento en la estabilidad de las moléculas frente al ataque enzimático.

*Palabras clave:* péptido antimicrobiano, Mastoparén MP-8, actividad hemolítica, estabilidad.

## SUMMARY

### Structural exploration of antibacterial activity and hemolytic profiles of non-natural analogs of the antimicrobial peptide mastoparan MP-8

In this work the relevance of a systematic replacement of peptide-bonds on the Mastoparan MP-8 antimicrobial peptide to afford 27 new pseudopeptide analogues is reported. Results allowed to determine that pseudopeptides  $\psi$ -38617 (INLKA-LAALAK<sup>d</sup>-[CH<sub>2</sub>NH]-RLL),  $\psi$ -38629 (INLKA<sup>d</sup>-[CH<sub>2</sub>NH]-LAALAKRLL) and  $\psi$ -38630 (INLK-[CH<sub>2</sub>NH]-ALAALAKRLL), showed an enhanced anti gram-negative bacterial properties, regarding the native Mastoparan MP-8 peptide, but maintaining a comparable activity against gram-positive bacteria. In addition, specific performed modifications on MP-8 sequence led three new molecules that completely abolished the hemolytic activity of the parent MP-8 peptide. All obtained molecules possess a high stability profile when tested against a severe proteolytic attack.

*Key words:* Antimicrobial peptide, Mastoparan MP-8, hemolytic activity, stability.

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones causadas por patógenos resistentes a múltiples fármacos ha promovido la búsqueda de nuevos y más potentes agentes antimicrobianos. La propuesta que ha tomado más fuerza en las últimas décadas la constituye una familia de compuestos denominados péptidos antimicrobianos. Estos agentes potencialmente terapéuticos han logrado convertirse en candidatos ideales para combatir además de bacterias, patógenos como hongos, virus, protozoos y células cancerosas [1].

A finales de la década de los ochenta, se descubrieron los péptidos antimicrobianos, cuando Zasloff [2] halló en un péptido de origen natural denominado Maganina, propiedades antimicrobianas. De manera general se puede decir que los péptidos antimicrobianos poseen un tamaño entre 14 y 40 residuos de aminoácidos, lo cual los convierte en moléculas con peso molecular variado así como su composición de aminoácidos, su estructura secundaria, su carga y sus características biológicas [3].

Los péptidos con actividad antimicrobiana son un componente conservado de la respuesta inmune innata y están ampliamente distribuidos en el reino animal. Estos péptidos pueden ser considerados de amplio espectro como potentes antibacterianos, ya que se ha demostrado que presentan actividad frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo cepas que son resistentes a los antibióticos de primera línea [4].

Por esta razón, diversos investigadores han enfocado sus estudios al reconocimiento de moléculas de origen natural con propiedades antifúngicas, antibacterianas y antivirales, dando lugar en la actualidad al reconocimiento de más de 1.000 péptidos [5] con actividad frente a una amplia variedad de microorganismos. No obstante, el esfuerzo no se ha enfocado solo en la búsqueda de estos péptidos de origen natural, encontrándose diversos reportes en los cuales se han elucidado los mecanismos de acción de estos péptidos y su relación con la secuencia o la estructura de dichas moléculas. Entre las clasificaciones más aceptadas de péptidos antimicrobianos se encuentra la descrita por Boman, Wade, Boman, Wihlint y Merrifield [6], quienes clasifican los péptidos antimicrobianos en tres clases: a) péptidos lineales, anfipáticos, libres de cisteína con estructura secundaria  $\alpha$  - hélice; b) péptidos formadores de enlace disulfuro lo cual da origen a la formación de estructura secundaria hoja  $\beta$ ; c) y finalmente péptidos con prevalencia de un aminoácido entre los cuales generalmente se encuentran Arginina (Arg), Triptófano (Trp), Prolina (Pro) o Histidina (His). En cuanto al mecanismo de actividad de los péptidos antimicrobianos frente a la membrana bacteriana, se ha podido establecer que el primer contacto es producto de interacciones electrostáticas entre ellos; de manera general se han podido elucidar tres modelos principales de acción: 1) modelo de barril; 2) modelo de canal y 3) modelo alfombra [7, 8].

Una familia particular de estas moléculas de origen animal que reportan actividad antimicrobiana es la de los mastoparanes, la cual fue aislada del veneno de avispa y cuya actividad antimicrobiana es reportada por numerosos autores [9, 10]. No obstante, reportes recientes en la literatura han demostrado que el péptido Mastoparán MP-8 (INLKALAALAKRLL) es causante de efectos no deseados como son la hemólisis; presenta degranulación celular actividad quimiotáctica y su vida media es relativamente corta [11]. Por lo cual, en este trabajo se propone una modificación puntual y sistemática en todos los enlaces de Mastoparán MP-8 para mantener o potenciar la actividad antibacteriana disminuyendo los efectos no deseados como la hemólisis, toxicidad celular y, además, prolongar su vida media.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Solventes y reactivos

N-Boc- $\alpha$ -L- aminoácidos protegidos, N-Boc- $\alpha$ -D- aminoácidos protegidos obtenidos de Bachem (Bachem, Torrance, CA, USA), O-(benzotriazol-1) N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato TBTU, fue obtenido de Bachem (Bachem, Torrance, CA, USA). Trietil-amina (TEA) desde Merck (Darmstadt, Germany). Hidruro de litio y aluminio ( $\text{LiAlH}_4$ ) desde Merck (Darmstadt, Germany). O,N-dimetil hidroxilamina desde Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, USA). Di-ciclohexil carbodimida (DCC),

N-(hidroxy- benzotriazol) (HOBt) obtenido de AAPPTec (Louisville, KY, USA). Ciano borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) desde Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, USA). Ninhidrina grado HPLC desde Merck (Bogotá, Colombia). Sodio metálico, tetrahidrofurano (THF) desde Fisher Scientific (Fair Lawn, NY, USA). Éter etílico ( $\text{Et}_2\text{O}$ ), acetato de etilo ( $\text{EtOAc}$ ), n-hexano, cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), metanol ( $\text{MeOH}$ ), trietilamina (TEA); diclorometano (DCM), N,N-dimetil-Formamida (DMF), diisopropil-etil-amina (DIEA) desde Merck (Bogotá, Colombia). Ácido trifluoroacético (TFA), Ácido fluorhídrico (HF).

### Síntesis del péptido Mastoparén y análogos péptidos miméticos en fase sólida

El diseño de cada uno de los pseudopéptidos sintetizados consistió en modificar, de manera sistemática, uno a uno los enlaces peptídicos naturales por enlaces no naturales tipo amida reducida; asimismo, se emplearon aminoácidos de configuración D, los cuales fueron modificados e incluidos en la secuencia peptídica.

La síntesis de pseudopéptidos involucra dos etapas principales: la primera consiste en la reducción del grupo carbonilo del aminoácido protegido por el grupo t-Boc hasta el aminoaldehído de cada uno de los aminoácidos de la secuencia; para realizar esta modificación se llevaron a cabo los procedimientos reportados por Guichard, Briand y Friede en 1993 [12] y por Carreño, Alba, Varela, Patarroyo y Lozano en 2011 [13]. La segunda parte de la síntesis se llevó a cabo siguiendo la estrategia de síntesis de péptidos en fase sólida t-Boc (SPPS) desarrollada por Merrifield [14] y luego modificada por Houghten [15]. El acople del aminoaldehído a la secuencia peptídica se realiza como lo describen Lozano, Salazar, Rivera y Patarroyo en su artículo publicado en 2006 [16]. Todos los aminoácidos utilizados eran aminoácidos protegidos en el grupo amino por el grupo t-Boc.

El péptido nativo MP-8, así como los pseudopéptidos análogos a él, fueron codificados por un número consecutivo que hace relación al número de moléculas sintetizadas en la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC). Estas secuencias con su respectivo código se muestran en la tabla 1.

### Cromatografía en capa delgada (CCD)

Esta cromatografía se llevó a cabo en placas de aluminio de sílica gel (sílica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck), empleando diferentes sistemas de solventes dependiendo del aminoácido que se va a modificar, para así realizar el seguimiento a la formación hasta el aminoaldehído de cada uno de los aminoácidos y por diferencia en los tiempos de retención fueron identificados los diferentes compuestos. El análisis se realizó por fluorescencia UV a una longitud de onda corta (254 nm) y mediante una reacción con ninhidrina (datos no mostrados).

60      Tabla 1. Diseño de los análogos no naturales del Mastoparán MP-8.

Código	Secuencia	Código	Secuencia
38611	NH <sub>3</sub> +- INLKALAALAKRLL-COONH <sub>2</sub>	ψ38624	INLKALA[CH <sub>2</sub> NH]ALAKRLL
ψ38612	INLKALAALAKRL[CH <sub>2</sub> NH]L	ψ38625	INLKALA <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]ALAKRLL
ψ38613	INLKALAALAKRL <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]L	ψ38626	INLKAL[CH <sub>2</sub> NH]AALAKRLL
ψ38614	INLKALAALAKR[CH <sub>2</sub> NH]LL	ψ38627	INLKAL <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]AALAKRLL
ψ38615	INLKALAALAKR <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]LL	ψ38628	INLKA[CH <sub>2</sub> NH]LAALAKRLL
ψ38616	INLKALAALAK[CH <sub>2</sub> NH]RLL	38629	INLKA <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]LAALAKRLL
ψ38617	INLKALAALAK <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]RLL	ψ38630	INLK[CH <sub>2</sub> NH]ALAALAKRLL
ψ38618	INLKALAALA[CH <sub>2</sub> NH]KRLL	ψ38631	INLK <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]ALAALAKRLL
ψ38619	INLKALAALA <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]KRLL	ψ38632	INL[CH <sub>2</sub> NH]KALAALAKRLL
ψ38620	INLKALAAL[CH <sub>2</sub> NH]AKRLL	ψ38633	INL <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]KALAALAKRLL
ψ38621	INLKALAAL <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]AKRLL	ψ38634	IN[CH <sub>2</sub> NH]LKALAALAKRLL
ψ38622	INLKALAA[CH <sub>2</sub> NH]LAKRLL	ψ38635	IN <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]LKALAALAKRLL
ψ38623	INLKALAA <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]LAKRLL	ψ38636	I[CH <sub>2</sub> NH]NLKALAALAKRLL
		ψ 38637	I <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]NLKALAALAKRLL

## **Espectroscopia IR**

Los espectros infrarrojos obtenidos se tomaron en un espectrómetro JASCO FT/IR-460 Plus (Tokio, Japón). Las muestras se analizaron en un equipo PIKE MIRacle AG con un ángulo de reflexión horizontal y una celda ATR (Pike Technologies, Madison, WI, USA). Cada uno de los compuestos analizados fue sometido a una presión de 21 psi (libras/pulgada<sup>2</sup>). Para la obtención de cada espectro se realizaron 64 barridos.

## **Resonancia magnética nuclear RMN H<sup>1</sup>**

Se realizó RMN H<sup>1</sup> a cada uno de los *N*- $\alpha$ -t-Boc aminoaldehídos sintetizados, así como a su correspondiente intermediario y producto de partida, tomando 10 mg del producto liofilizado, disolviéndolo en dimetilsulfóxido deuterado (99,9% de pureza) o en cloroformo deuterado (99,8% de pureza) + 1% v/v de tetrametilsilano (TMS) + lámina de plata (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, ma, usa) para un volumen final de 0,5 ml. Para cada muestra se realizaron 64 barridos en un espectrofotómetro Bruker DRX 500 MHz a 300 K.

## **Caracterización por HPLC y espectrometría de masas**

Todos los pseudopéptidos sintetizados se caracterizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa HPLC-FR en un cromatógrafo Merck-Hitachi L4250 analítico de inyección automática (Hitachi Ltd., Tokio, Japón), que posee un detector uv-vis. La longitud de onda del análisis fue de 210 nm y la columna empleada fue una columna de sílice-C18 de 4,5 mm  $\times$  30 cm. En cada una de las corridas cromatográficas se sembró la muestra disuelta en agua + 0,01% TFA a una concentración final de 0,2 mg / 200  $\mu$ L.

Se realizó a cada una de las moléculas sintetizadas espectrometría de masas en un equipo de masas Bruker, empleando una matriz de desorción-ionización (MALDI) y se empleó la técnica tiempo de vuelo (TOF). El equipo utiliza radiación de nitrógeno que irradia a una longitud de onda de 337 nm, manteniendo un número mínimo de disparos de  $2 \times 10^{-7}$  y una energía láser de pulso mayor a 150  $\mu$ J/pulso; el voltaje de reflexión fue de 20 kV y un voltaje reflector de 20 kV. Como matriz se empleó ácido 4-ciano-hidroxi-cinámico (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO). En la placa de análisis se sembró 3  $\mu$ L de una mezcla matriz – muestra en una concentración final de muestra de 100 pmol/pL.

## **Determinación de sensibilidad de las bacterias frente a pseudopéptidos – ensayo de difusión radial**

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los péptidos y pseudopéptidos sintetizados se determinó enfrentando cada uno de ellos a una serie de cepas de bacterias

estándar ATCC (*American Type Culture Collection*) Gram positivas, entre las cuales se encuentran: (*Streptococcus mutans*) ATCC 31989, (*Enterococcus faecalis*) ATCC 29212 y (*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538; y cepas Gram negativas, entre las cuales se encuentran: (*Salmonella typhimurium*) ATCC EG10627, (*Salmonella typhimurium*) ATCC 14028s, (*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC C-674, (*Salmonella typhimurium*) MS7953 y (*Escherichia coli*) ATCC 25922.

El ensayo para determinar la actividad antibacteriana de cada uno de los pseudopéptidos sintetizados se realizó mediante el ensayo de difusión radial. Este experimento consiste en sembrar en cajas de Petri medio de cultivo (agarosa -TSB), el cual contiene  $4 \times 10^7$  UFC de bacteria. Después de gelificado el medio se procede a abrir pozos pequeños de diámetro fijo en donde se siembra el péptido o pseudopéptido (10  $\mu$ L de cada muestra a una concentración de 1 mg/ml). Finalmente se cubren los pozos con un medio de agar rico en TSB, se deja solidificar y se incuba toda la noche a 37 °C; por último, se evalúa la inhibición del crecimiento de la bacteria en función del halo formado alrededor del pozo. El experimento se repitió con cada una de las bacterias mencionadas anteriormente y con cada uno de los pseudopéptidos sintetizados; el diámetro del halo de inhibición se midió en milímetros.

#### **Determinación de la actividad hemolítica de los pseudopéptidos análogos del Mastoparén MP-8**

Para determinar la actividad hemolítica de las moléculas sintetizadas, así como la del péptido nativo, se tomó sangre de cordero, y se obtuvieron los glóbulos rojos por centrifugación de la sangre a 3.000 rpm por 5 min; luego se preparó una solución de glóbulos rojos al 4% en solución fisiológica. La determinación de actividad hemolítica se realizó en cajas de 96 pozos, se sembraron 100  $\mu$ L de muestra a una concentración de 1 mg/mL y 100  $\mu$ L de glóbulos rojos, alcanzando un volumen final de 200  $\mu$ L por pozo; se incubó a 37 °C por 1 hora. Pasado este tiempo, se centrifugó la caja a 5.000 rpm por 10 min, se tomó el sobrenadante y se llevó a una caja de 96 pozos nueva y, finalmente, se realizó una lectura de absorbancia a 405 nm en un microlector Labsystems Multiskan MS proveniente de Biocientífica, Ltda. (Bogotá, Colombia), tipo Elisa.

#### **Determinación de la estabilidad frente a peptidasas**

Se determinó la resistencia al ataque proteolítico de cada una de las moléculas sintetizadas frente a exo- y endoproteasas presentes en dos extractos enzimáticos, los cuales presentan características enzimáticas diferentes. El primer extracto empleado fue el suero normal humano (SNH) tomado de un paciente sano; el segundo extracto empleado fue el citosólico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. A cada uno de los extractos se les determinó la concentración de proteína empleando el *test* de determinación de proteína por ácido bicinonínico. La determinación de la actividad frente a proteasas consiste

en tomar 40  $\mu\text{L}$  de PBS pH 7,2; 60  $\mu\text{L}$  de SNH (17,3 mg/ml), y 100  $\mu\text{L}$  de péptido o pseudopéptido (1 mg/ml). Se mantiene la reacción a una temperatura de 37 °C y se toman muestras de 20  $\mu\text{L}$  a determinados intervalos de tiempo, frenando la reacción con TFA al 0,1%. La determinación de resistencia de cada una de las moléculas frente al conjunto de enzimas presentes en el extracto citosólico se realizó manteniendo las condiciones anteriores.

## RESULTADOS

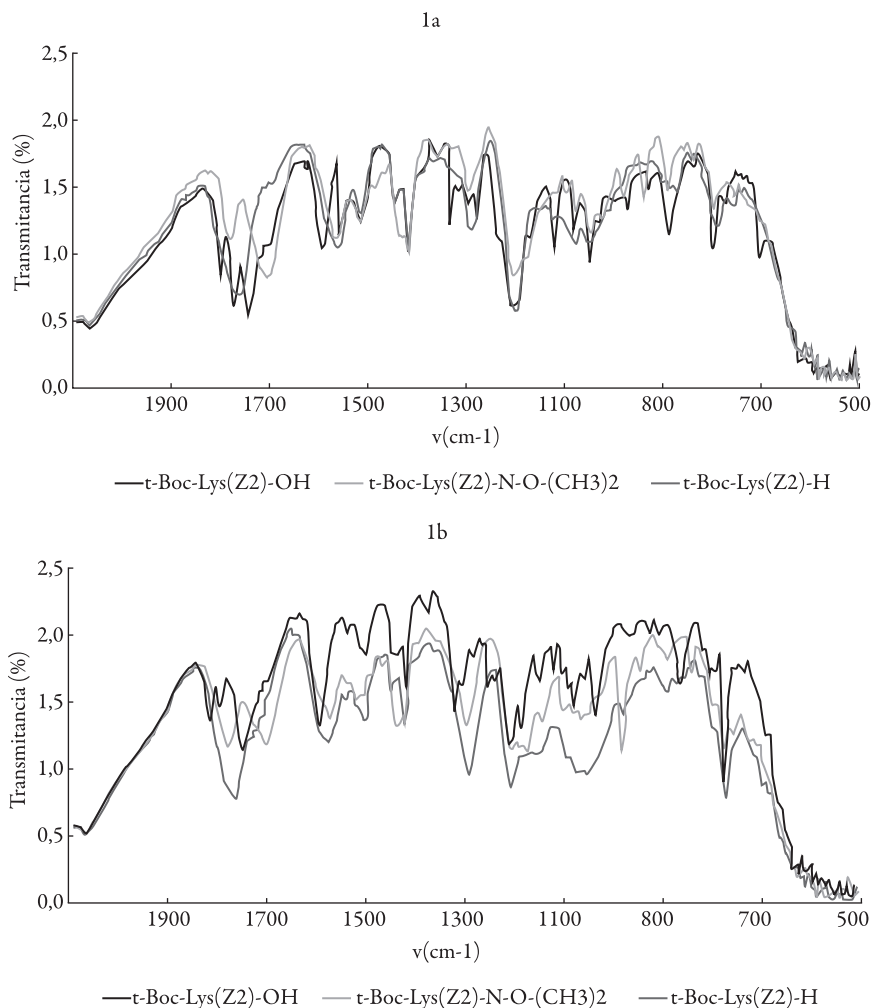
### Caracterización de los pseudopéptidos sintetizados

La primera etapa de la síntesis de pseudopéptidos involucra la síntesis y caracterización de cada uno de los aminoaldehídos incluidos en la secuencia peptídica. Los resultados obtenidos de la caracterización por IR y RMN<sup>1</sup>H para dos de los aminoaldehídos sintetizados se muestran en las figuras 1 y 2, respectivamente.

En la figura 1a puede verse el espectro infrarrojo de *N*- $\alpha$ -t-Boc Isoleucina-OH y sus correspondientes derivados, en donde se observa en el espectro inicial del aminoácido no modificado tres bandas características de flexiones en el plano, propias del grupo carbonilo de un ácido carboxílico en 1.722  $\text{cm}^{-1}$ , 1.696  $\text{cm}^{-1}$  y 1.665  $\text{cm}^{-1}$ . Como puede notarse, en el espectro de la carboxamida estas bandas desaparecen observándose en su lugar dos bandas en 1.700  $\text{cm}^{-1}$  y 1.629  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a flexiones del grupo C=O y al estiramiento N-C=O, respectivamente. Finalmente, en el espectro del correspondiente aminoaldehído se puede observar la aparición de una señal un poco ancha en 1.682  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente a las flexiones en el plano del grupo H-C=O. Las señales restantes del espectro no son analizadas, puesto que en los tres espectros las bandas se superponen, con lo cual se comprueba que durante el proceso de síntesis solo está siendo modificado el grupo carboxilo de la molécula, manteniéndose inmodificables los demás grupos funcionales de la molécula. En la figura 1b, al igual que en la figura 1a, solo se destacan los desplazamientos correspondientes al grupo carboxilo de *N*- $\alpha$ -t-Boc Lisina (Z2)-OH y sus correspondientes derivados, en donde pueden destacarse en el espectro inicial del aminoácido no modificado dos bandas características de flexiones en el plano, propias del grupo carbonilo de un ácido carboxílico en 1.733  $\text{cm}^{-1}$  y 1.669  $\text{cm}^{-1}$ . Como puede verse, en el espectro de la carboxamida estas bandas desaparecen, observándose en su lugar dos bandas en 1.697  $\text{cm}^{-1}$  y 1.620  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden a flexiones del grupo C=O y al estiramiento N-C=O, respectivamente. Finalmente, en el espectro del correspondiente aminoaldehído se puede observar la aparición de una señal un poco ancha en 1.634  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente a flexiones en el plano del grupo



H-C=O. Al igual que en el espectro anterior, solo se destacan las bandas características del grupo carboxilo del aminoácido y sus derivados.



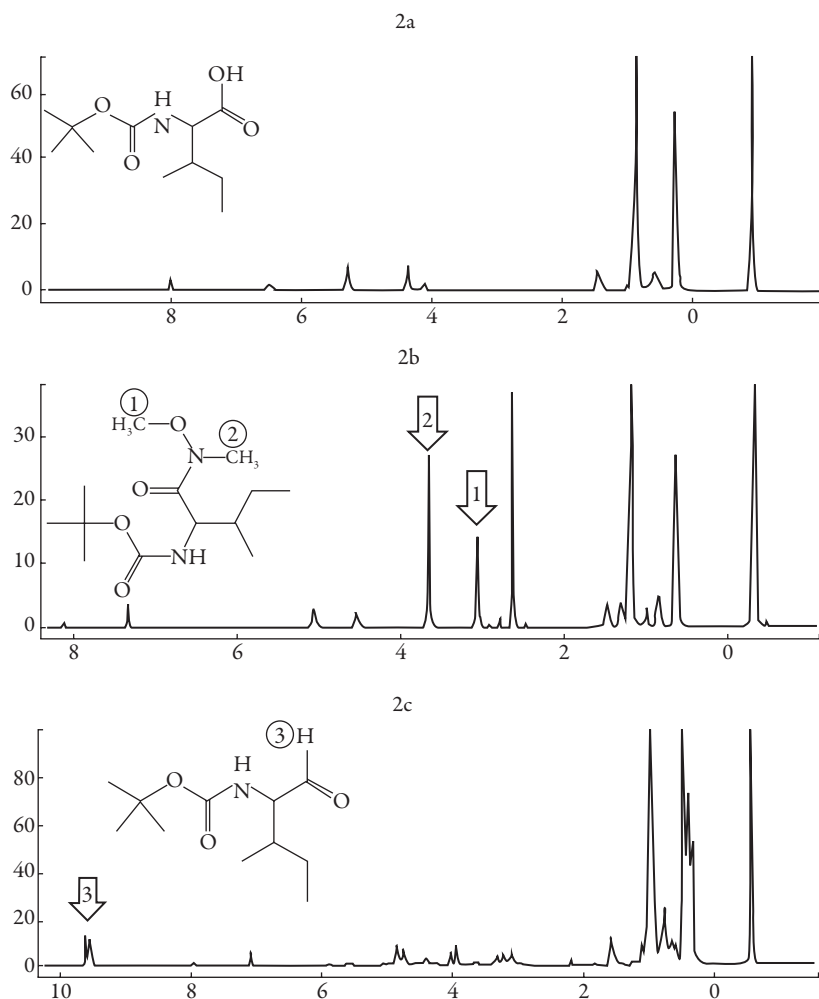
1a: Espectro IR *N*- $\alpha$ -t-Boc Isoleucina y sus correspondientes derivados;

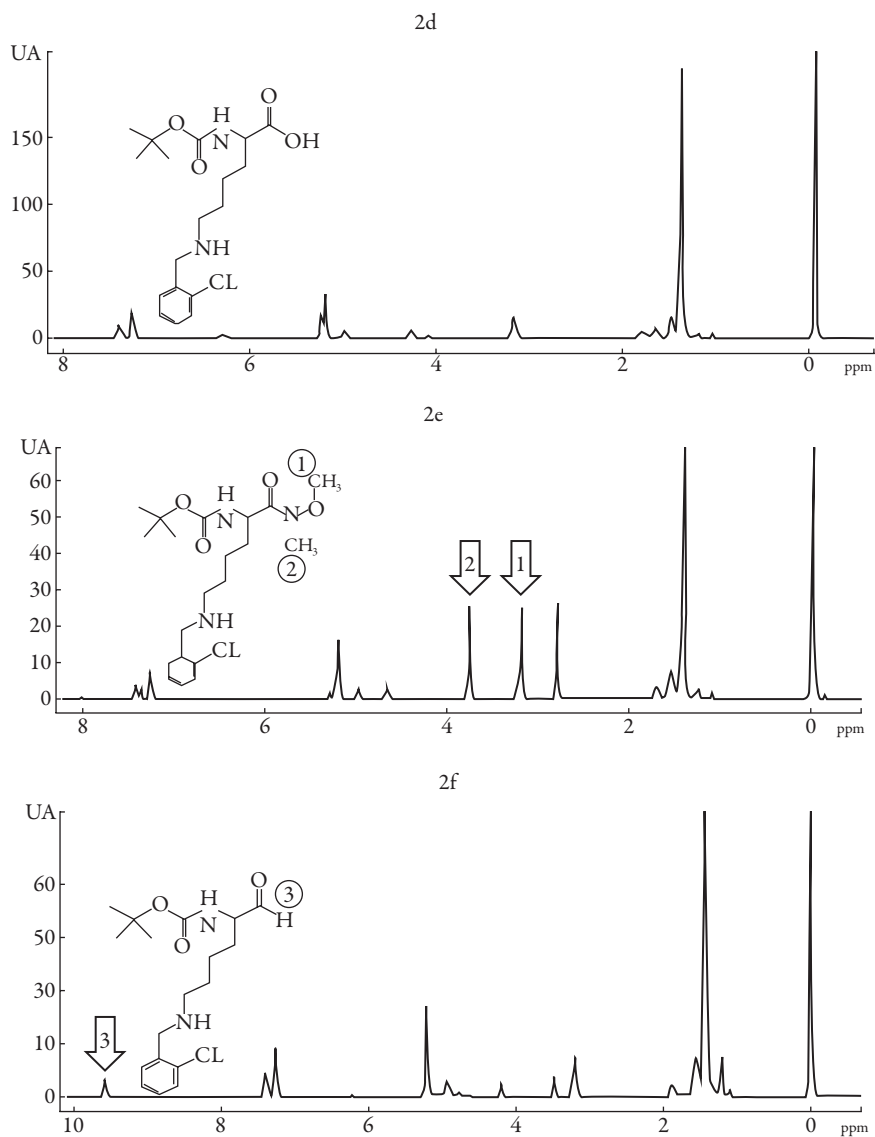
1b: Espectro IR *N*- $\alpha$ -t-Boc Lisina y sus correspondientes derivados.

Figura 1. Caracterización espectroscópica por infrarrojo.

En la figura 2 se observa la caracterización obtenida por resonancia magnética nuclear protónica de dos de los aminoácidos modificados *N*- $\alpha$ -t-Boc Isoleucina-OH y *N*- $\alpha$ -t-Boc Lisina (Z2)-OH, destacándose en el espectro 2b y 2e el desplazamiento de los

protones de los grupos metilo de la carboxamida en 3,2 ppm y 3,7 ppm de cada uno de los aminoácidos anteriormente mencionados; en el espectro 2c puede observarse una señal en 9,55 ppm correspondiente al protón del aminoaldehído de *N*- $\alpha$ -t-Boc Isoleucina-H; de igual forma puede observarse en el espectro 2d la aparición de una señal en 9,58 ppm correspondiente al hidrógeno del aminoaldehído de *N*- $\alpha$ -t-Boc Lisina (Z2)-H. Al igual que en el análisis realizado para los espectros infrarrojos, en este caso solo se destacan los protones de los grupos metilo de la carboxamida y el protón de cada uno de los aminoaldehídos sintetizados, ya que los protones restantes de las moléculas modificadas no sufren ninguna alteración durante el proceso de síntesis.





2a: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de  $N$ - $\alpha$ -t-Boc Ile-OH;

2b: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de  $N$ - $\alpha$ -t-Boc Ile-  $(\text{N}-\text{O}(\text{CH}_3))_2$ ;

2c: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de  $N$ - $\alpha$ -t-Boc Ile-H;

2d: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de  $N$ - $\alpha$ -t-Boc Lys-OH;

2e: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de  $N$ - $\alpha$ -t-Boc Lys-  $(\text{N}-\text{O}(\text{CH}_3))_2$ ;

2f: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de  $N$ - $\alpha$ -t-Boc Lys-H.

Figura 2. Caracterización espectroscópica por RMN- $^1\text{H}$ .

Se modificaron en este trabajo un total de doce aminoácidos, seis de configuración L, y seis de configuración D, (Ala, Asn, Arg, Ile, Leu y Lys), todos protegidos por el grupo t-Boc en el grupo amino del carbono alfa, y en el caso de Asparagina (Asn), Lisina (Lys) y Arginina (Arg) los aminoácidos se encontraban protegidos en la cadena lateral; de cada una de estas síntesis se puede concluir que se obtuvo el producto esperado con rendimientos que oscilan entre el 60% y 80% con una pureza superior al 90% en todos los casos. La figura 3 representa un esquema general de la síntesis de pseudopéptidos en fase sólida, siguiendo los protocolos propuestos por Merrifield en los años sesenta, metodología modificada por Houghten a mediados de los años ochenta.

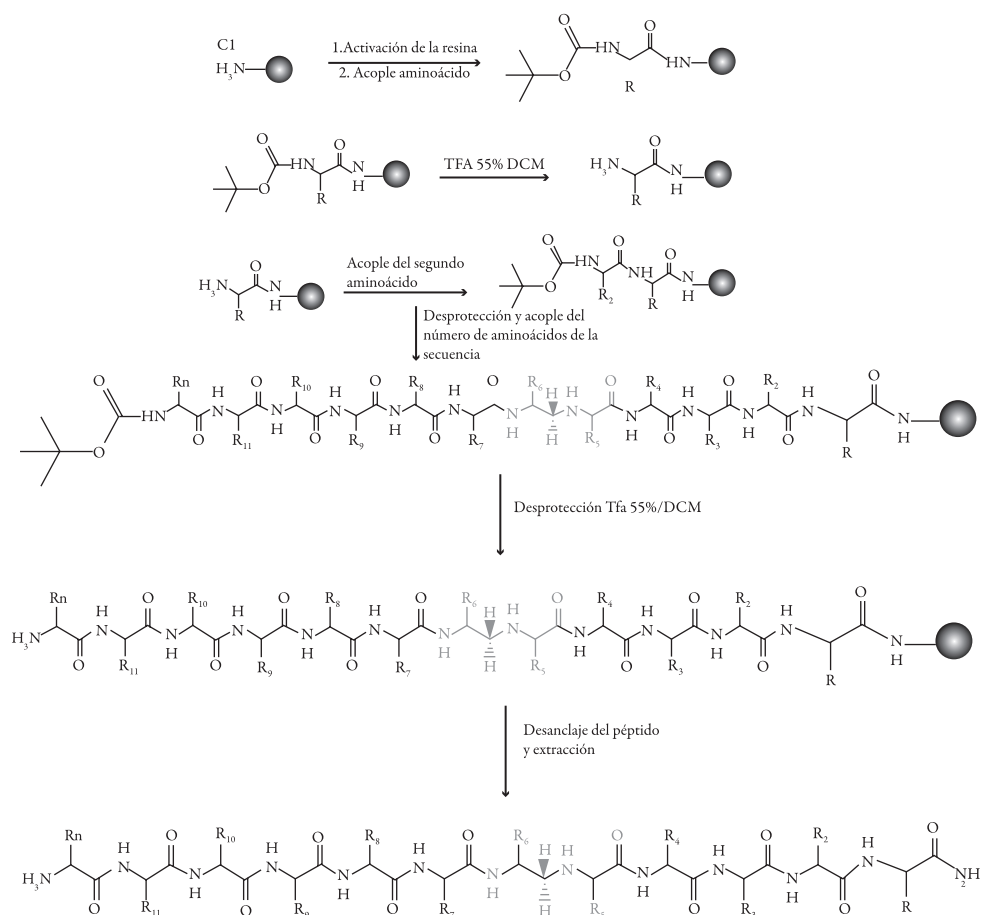


Figura 3. Esquema general de la síntesis de péptidos o pseudopéptidos en fase sólida siguiendo la estrategia de síntesis t-Boc.

En cuanto a la síntesis de los pseudopéptidos obtenidos con base en los perfiles cromatográficos por HPLC y por espectroscopia de masas MALDI-TOF, se puede afirmar que en todos los casos se obtuvo el producto esperado con la modificación deseada; el producto crudo fue obtenido con una pureza cercana al 60%, realizándose en todos los casos una purificación por cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC. Finalmente se obtuvo el compuesto deseado con una pureza superior al 95%; los resultados obtenidos después de realizar la purificación se presentan en la tabla 2.

### Determinación de sensibilidad de bacterias a los pseudopéptidos – difusión radial

La determinación de actividad por difusión radial es una técnica ampliamente reportada en la literatura, debido a que el ensayo es relativamente sencillo de realizar y brinda información veraz acerca del comportamiento de las bacterias frente a un determinado agente terapéutico. En este documento presentamos los resultados obtenidos del comportamiento de cada una de las bacterias objeto de estudio, frente a cada uno de los pseudopéptidos sintetizados, y realizamos una comparación al comportamiento observado frente al péptido nativo Mastoparén MP-8 y frente a algunos antibióticos comerciales.

En la figura 4 se puede observar una fotografía que refleja de manera general el comportamiento de los pseudopéptidos frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas; asimismo, se puede observar la actividad mostrada por el péptido nativo y por algunos antibióticos comerciales. En la tabla 3 se presentan las unidades de actividad determinadas para cada una de las moléculas ensayadas frente a cada una de las bacterias estudiadas.

C-674 (*Pseudonoma aeruginosa*)

29212 (*Enterococcus faecalis*)

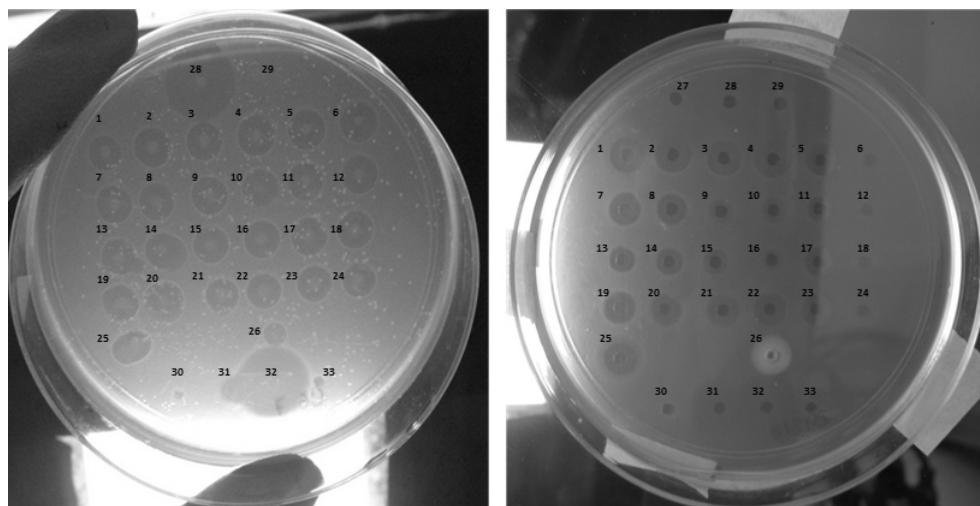


Figura 4. Sensibilidad bacteriana frente al péptido nativo MP-8 y sus análogos no naturales.

Tabla 2. Caracterización por HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF de las moléculas sintetizadas.

Péptido / pseudopéptido	PM (Da) esperado	MH+H (uma) para el pico principal	Tiempo de retención pico principal (min)
38611	1508,3	1507,7	36,97
ψ38612	1494,3	1495,1	30,2
ψ38613	1494,3	1494,6	29,6
ψ38614	1494,3	1494,9	35,33
ψ38615	1494,3	1494,2	30,0
ψ38616	1494,3	1494,3	28,01
ψ38617	1494,3	1494,1	33,33
ψ38618	1494,3	1494,0	26,51
ψ38619	1494,3	1494,4	35,12
ψ38620	1494,3	1494,4	26,11
ψ38621	1494,3	1494,5	26,17
ψ38622	1494,3	1494,4	31,32
ψ38623	1494,3	1494,3	25,69
ψ38624	1494,3	1494,7	33,16
ψ38625	1494,3	1494,5	25,52
ψ38626	1494,3	1494,6	24,88
ψ38627	1494,3	1494,8	33,33
ψ38628	1494,3	1494,7	25,68
ψ38629	1494,3	1494,5	31,33
ψ38630	1494,3	1494,5	25,38
ψ38631	1494,3	1494,2	28,01
ψ38632	1494,3	1494,0	25,99
ψ38633	1494,3	1492,7	26,78
ψ38634	1494,3	1493,2	30,22
ψ38635	1494,3	1493,7	29,45
ψ38636	1494,3	1494,7	35,26
ψ38637	1494,3	1494,8	33,32

Tabla 3. Sensibilidad bacteriana al Mastoparán MP-8 y sus análogos pseudopéptidos.

GRAM (-)							GRAM (+)						
Péptido	Pozo	Secuencia	EG 10627 (UA)	14018 C-674 (UA)	Ms 7953 (UA)	25922 (UA)	Péptido	Pozo	Secuencia	31989 (UA)	29212 (UA)	6538 (UA)	
38611	1	INLKALAALAKRLL	65,0	70,0	55,0	90,0	70,0	38611	1	INLKALAALAKRLL	70,0	70,0	60,0
ψ38612	2	INLKALAALAKRL <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]L	75,0	80,0	70,0	80,0	70,0	ψ38612	2	INLKALAALAKRL <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]L	80,0	70,0	60,0
ψ38614	3	INLKALAALAKR[CH <sub>2</sub> NH]LL	70,0	85,0	65,0	75,0	80,0	ψ38614	3	INLKALAALAKR[CH <sub>2</sub> NH]LL	65,0	70,0	60,0
ψ38615	4	INLKALAALAKR <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]LL	70,0	85,0	70,0	80,0	80,0	ψ38615	4	INLKALAALAKR <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]LL	60,0	80,0	65,0
ψ38616	5	INLKALAALAK[CH <sub>2</sub> NH]RLL	75,0	85,0	65,0	75,0	70,0	ψ38616	5	INLKALAALAK[CH <sub>2</sub> NH]RLL	40,0	60,0	40,0
ψ38617	6	INLKALAALAK <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]RLL	75,0	80,0	80,0	80,0	85,0	ψ38617	6	INLKALAALAK <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]RLL	40,0	65,0	35,0
ψ38618	7	INLKALAALA[CH <sub>2</sub> NH]KRLL	70,0	85,0	60,0	75,0	70,0	ψ38618	7	INLKALAALA[CH <sub>2</sub> NH]KRLL	50,0	65,0	0,0
ψ38619	8	INLKALAALA <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]KRLL	70,0	80,0	65,0	80,0	75,0	ψ38619	8	INLKALAALA <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]KRLL	45,0	60,0	40,0
ψ38620	9	INLKALAAL[CH <sub>2</sub> NH]AKRLL	70,0	80,0	70,0	80,0	70,0	ψ38620	9	INLKALAAL[CH <sub>2</sub> NH]AKRLL	0,0	40,0	35,0
ψ38621	10	INLKALAAL <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]AKRLL	70,0	75,0	70,0	80,0	80,0	ψ38621	10	INLKALAAL <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]AKRLL	0,0	50,0	0,0
ψ38622	11	INLKALAA[CH <sub>2</sub> NH]LAKRLL	65,0	80,0	70,0	80,0	75,0	ψ38622	11	INLKALAA[CH <sub>2</sub> NH]LAKRLL	0,0	45,0	0,0
ψ38623	12	INLKALAA <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]LAKRLL	95,0	90,0	75,0	80,0	75,0	ψ38623	12	INLKALAA <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]LAKRLL	0,0	45,0	0,0
ψ38624	13	INLKALA[CH <sub>2</sub> NH]ALAKRLL	65,0	80,0	65,0	75,0	80,0	ψ38624	13	INLKALA[CH <sub>2</sub> NH]ALAKRLL	40,0	50,0	0,0
ψ38625	14	INLKALA <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]ALAKRLL	70,0	80,0	75,0	85,0	80,0	ψ38625	14	INLKALA <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]ALAKRLL	40,0	60,0	0,0
ψ38626	15	INLKAL[CH <sub>2</sub> NH]AALAKRLL	65,0	80,0	70,0	80,0	75,0	ψ38626	15	INLKAL[CH <sub>2</sub> NH]AALAKRLL	35,0	50,0	0,0
ψ38627	16	INLKAL <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]AALAKRLL	70,0	80,0	65,0	80,0	75,0	ψ38627	16	INLKAL <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]AALAKRLL	0,0	40,0	0,0
ψ38628	17	INLKA[CH <sub>2</sub> NH]LAALAKRLL	75,0	80,0	70,0	80,0	80,0	ψ38628	17	INLKA[CH <sub>2</sub> NH]LAALAKRLL	40,0	65,0	35,0

(Continúa)

Tabla 3. Sensibilidad bacteriana al Mastoparán MP-8 y sus análogos pseudo péptidos (continuación).

GRAM (-)				GRAM (+)			
Péptido	Pozo	Secuencia	EG 10627 (UA)	C-67 <sup>4</sup> (UA)	Ms 7953 (UA)	25922 (UA)	
							31989 29212 6538 (UA) (UA) (UA)
ψ38629	18	INLKA <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH] <sup>l</sup> LAALAKRLL	75,0	85,0	70,0	75,0	80,0
ψ38630	19	INLK[CH <sub>2</sub> NH] <sup>l</sup> JALAALAKRLL	65,0	90,0	80,0	75,0	80,0
ψ38631	20	INLK <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH] <sup>l</sup> JALAALAKRLL	70,0	80,0	80,0	75,0	80,0
ψ38632	21	INL[CH <sub>2</sub> NH] <sup>l</sup> KALAALAKRLL	70,0	85,0	65,0	80,0	80,0
ψ38633	22	INL <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH] <sup>l</sup> KALAALAKRLL	75,0	85,0	70,0	80,0	80,0
ψ38635	23	IN <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH] <sup>l</sup> JALAALAKRLL	75,0	90,0	80,0	75,0	75,0
ψ38636	24	I[CH <sub>2</sub> NH] <sup>l</sup> NLKALAALAKRLL	60,0	75,0	65,0	85,0	70,0
ψ38637	25	I <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH] <sup>l</sup> NLKALAALAKRLL	45,0	75,0	70,0	90,0	80,0
		Protamina	45,0	0,0	45,0	0,0	55,0
		Amoxicilina 1:10	ND	0,0	0,0	ND	ND
		Gentamicina 1:10	ND	0,0	125,0	ND	ND
		Penicilina (stock)	ND	0,0	0,0	ND	55,0
		Ampicilina 1:500	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		Kanamicina 1:10	3,5	11,5	0,0	10,0	165,0
		Tetraciclina 1:10	0,0	17,5	160,0	0,0	160,0
		PBS	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0



Los ensayos de difusión radial realizados para determinar la actividad antibacteriana de cada una de las moléculas sintetizadas, evidencian que contamos con moléculas que presentan un amplio espectro de actividad destacando pseudopéptidos que mostraron ser activos frente a las bacterias Gram negativas y Gram positivas. Se hallaron en los resultados frente a todas las bacterias estudiadas por lo menos un pseudopéptido con actividad superior al péptido nativo, como por ejemplo, el pseudopéptido  $\psi$ -38623 NLKALAA<sup>d</sup>[CH<sub>2</sub>NH]LAKRLL, el cual mostró mayor actividad frente a las bacterias Gram negativas ATCC EG 10627, 14028 y C-674. Asimismo, pueden destacarse los pseudopéptidos  $\psi$ -38623 a  $\psi$ -38633 y el pseudopéptido  $\psi$ -38637, los cuales mostraron mayor actividad que el péptido nativo frente a la bacteria Gram negativa ATCC 25922. En cuanto a los resultados obtenidos frente a las bacterias Gram positivas estudiadas, se pueden destacar los pseudopéptidos  $\psi$ -38612 y  $\psi$ -38636, los cuales mostraron ser más activos que el péptido Mastoparán MP-8.

De manera general se puede decir que los análogos a Mastoparán MP-8 tipo amida reducida sintetizados mostraron en su mayoría ser más activos que el péptido nativo frente a las bacterias Gram negativas; por el contrario, no se observó el mismo comportamiento frente a las bacterias Gram positivas, notándose que algunos de ellos no fueron activos a la concentración estudiada. Sin embargo, se pueden destacar los pseudopéptidos  $\psi$ -38615 INLKALAALAKR-[CH<sub>2</sub>NH]-LL,  $\psi$ -38636 I-[CH<sub>2</sub>NH]-NLKALAALAKRLL y  $\psi$ -38637 I<sup>d</sup>[CH<sub>2</sub>NH]NLKALAALAKRLL, los cuales mostraron actividad superior a MP-8 frente a las bacterias Gram positivas.

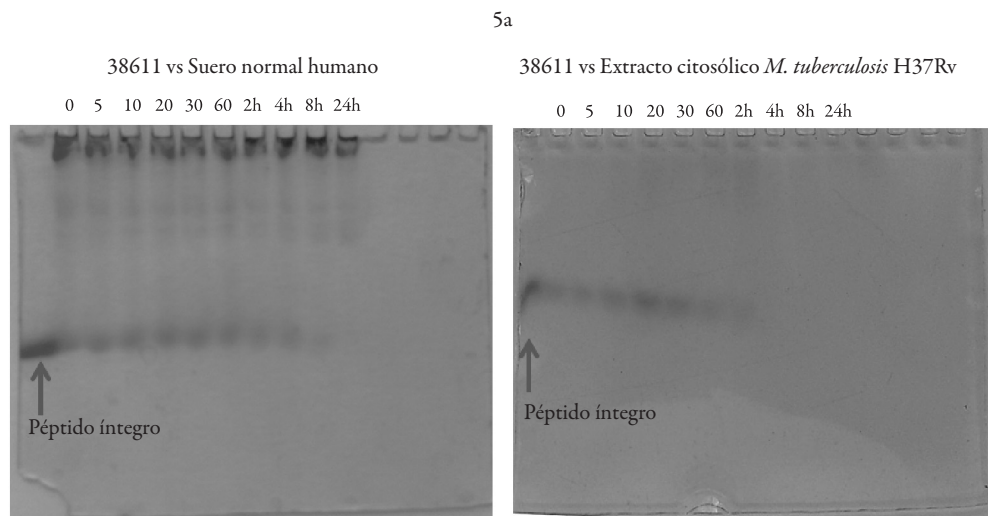
### Determinación de la actividad hemolítica de los pseudopéptidos

Los resultados del ensayo de hemólisis se muestran en la figura 6, donde se puede observar que el péptido no modificado 38611 a una concentración de 1 mg/ml es 100% hemolítico, al igual que los pseudopéptidos  $\psi$ -38612,  $\psi$ -38634,  $\psi$ -38635,  $\psi$ -38636 y  $\psi$ -38637. Con este ensayo se pudo determinar que la mayoría de los pseudopéptidos sintetizados mostraron un porcentaje de hemólisis cercano al 30% a una concentración de 1 mg/ml, mientras que los pseudopéptidos  $\psi$ -38617,  $\psi$ -38623,  $\psi$ -38629 y  $\psi$ -38630 no son hemolíticos a la concentración empleada (1 mg/ml), y se destaca que tres de ellos  $\psi$ -38617,  $\psi$ -38623 y  $\psi$ -38629 se modificaron simultáneamente en el enlace peptídico como metilenamino ( $\psi$ -[CH<sub>2</sub>-NH]-) de configuración local D (dextrógira).

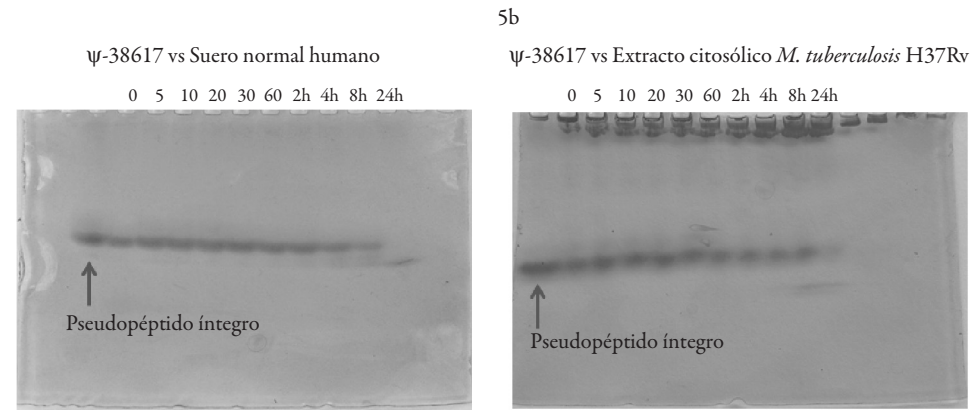
### Determinación de la resistencia a la degradación de los pseudopéptidos por peptidasas de diversa naturaleza

Los resultados de resistencia al ataque por parte de las proteasas obtenidos para cada uno de los pseudopéptidos sintetizados al igual que para el péptido nativo se muestran en la tabla 4; además, se presentan los geles obtenidos a manera de ejemplo para el

péptido nativo y para uno de los pseudopéptidos en la figura 5. Como puede observarse en la figura 6, la sustitución sistemática de enlaces peptídicos de la secuencia del péptido antibiótico denominado Mastoparén MP-8, evidenció que algunos de los análogos producidos evadieron totalmente la actividad hemolítica propia de la molécula nativa MP-8. Los resultados de hidrólisis obtenidos frente al suero normal humano muestran que el tiempo de hidrólisis del péptido nativo es de 60 minutos; contrario a ello se observa que todas las modificaciones indujeron resistencia a la hidrólisis de proteasas, dando como resultado valores en actividad específica superior a la hallada para el péptido nativo. Además, se pudo determinar que las modificaciones realizadas hacia el extremo carboxilo de la secuencia fueron los pseudopéptidos que indujeron mayor resistencia a la hidrólisis enzimática por parte de las endo- y exopeptidasas presentes tanto en el SNH como en el extracto citosólico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. En la misma tabla se puede observar claramente el efecto de una modificación quiral en estas moléculas, puesto que en la mayoría de ellas el tiempo de degradación del pseudopéptido modificado con un aminoaldehído de configuración D fue mayor al de su análogo de configuración L, lo cual coincide con lo esperado, ya que el SNH y el extracto citosólico no presentan proteasas para hidrolizar enlaces en los que se encuentren involucrados aminoácidos de configuración D.



5a: Estabilidad del péptido 38611 frente al suero normal humano SNH y extracto citosólico;  
Figura 5. Caracterización electroforética de la estabilidad peptídica frente a las proteasas.



5b: Estabilidad del pseudopéptido ψ-38617 frente al suero normal humano (SNH) y extracto citosólico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Figura 5. Caracterización electroforética de la estabilidad peptídica frente a las proteasas.

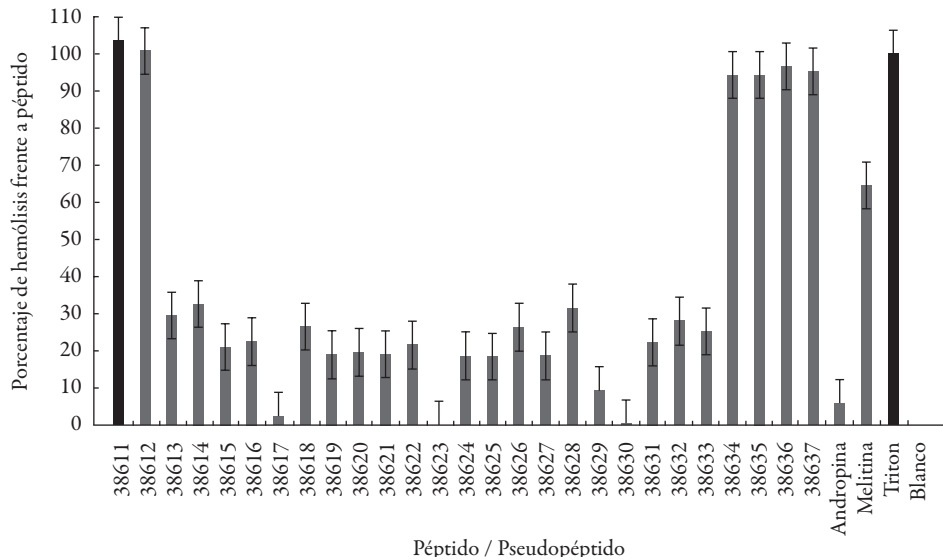


Figura 6. Porcentaje de hemólisis hallado para cada una de las moléculas sintetizadas.

Tabla 4. Tiempo de vida media y actividad de cada uno de los pseudopéptidos frente a las peptidasas de SNH y extracto citosólico *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Péptido/ pseudo- péptido	Secuencia	Tiempo de vida media $t_{50}$ (min)	(nmol/ $\mu$ g x min x 10 <sup>-4</sup> )	Tiempo de vida media $t_{50}$ (min)	(nmol/ $\mu$ g x min x 10 <sup>-4</sup> )
38611	NH <sup>+</sup> <sub>3</sub> -INLKALAALAKRLL- CONH <sub>2</sub>	60	0,11	60	0,54
$\psi$ 38612	INLKALAALAKRL[CH <sub>2</sub> NH]L	480	1,34	480	6,75
$\psi$ 38613	INLKALAALAKRL <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]L	480	1,34	120	0,27
$\psi$ 38614	INLKALAALAKR[CH <sub>2</sub> NH]LL	240	2,68	120	0,27
$\psi$ 38615	INLKALAALAKR <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]LL	1440	44,7	480	6,75
$\psi$ 38616	INLKALAALAK[CH <sub>2</sub> NH]RLL	1440	44,7	480	6,75
$\psi$ 38617	INLKALAALAK <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]RLL	1440	44,7	480	6,75
$\psi$ 38618	INLKALAALA[CH <sub>2</sub> NH]KRLL	480	1,34	480	6,75
$\psi$ 38619	INLKALAALA <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]KRLL	1440	44,7	480	6,75
$\psi$ 38620	INLKALAAL[CH <sub>2</sub> NH]AKRLL	480	1,34	480	6,75
$\psi$ 38621	INLKALAAL <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]AKRLL	480	1,34	240	0,14
$\psi$ 38622	INLKALAA[CH <sub>2</sub> NH]LAKRLL	480	1,34	480	6,75
$\psi$ 38623	INLKALAA <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]LAKRLL	480	1,34	480	6,75
$\psi$ 38624	INLKALA[CH <sub>2</sub> NH]ALAKRLL	240	2,68	NR	ND
$\psi$ 38625	INLKALA <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]ALAKRLL	240	2,68	NR	ND
$\psi$ 38626	INLKAL[CH <sub>2</sub> NH]AALAKRLL	240	2,68	15	0,022
$\psi$ 38627	INLKAL <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]AALAKRLL	480	1,34	15	0,022
$\psi$ 38628	INLKA[CH <sub>2</sub> NH]LAALAKRLL	60	0,11	NR	ND
$\psi$ 38629	INLKA <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]LAALAKRLL	240	2,68	NR	ND
$\psi$ 38630	INLK[CH <sub>2</sub> NH]ALAALAKRLL	120	5,37	NR	ND
$\psi$ 38631	INLK <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]ALAALAKRLL	240	2,68	NR	ND
$\psi$ 38632	INL[CH <sub>2</sub> NH]KALAALAKRLL	120	5,37	NR	ND
$\psi$ 38633	INL <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]KALAALAKRLL	240	2,68	NR	ND
$\psi$ 38634	IN[CH <sub>2</sub> NH]LKALAALAKRLL	240	2,68	NR	ND
$\psi$ 38635	IN <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]LKALAALAKRLL	120	5,37	NR	ND
$\psi$ 38636	I[CH <sub>2</sub> NH]NLKALAALAKRLL	240	2,68	NR	ND
$\psi$ 38637	I <sup>d</sup> [CH <sub>2</sub> NH]NLKALAALAKRLL	120	5,37	NR	ND

NR: no realizado, ND: no determinado

## DISCUSIÓN

Si se deseara clasificar los pseudopéptidos analizados, en alguna de las clasificaciones generalmente reportadas en la literatura para péptidos antimicrobianos, se podría decir que los pseudopéptidos análogos a Mastoparén MP-8 sintetizados en este trabajo, pueden ser incluidos en la clasificación de secuencias con actividad antimicrobiana ricas en un aminoácido en este caso alanina.

Los resultados obtenidos del ensayo de actividad antibacteriana y de hemólisis, claramente dejan ver que nos encontramos frente a secuencias que lograron potenciar la actividad antibacteriana de Mastoparén MP-8, y, además de ello, no son hemolíticas como sí mostró serlo el péptido nativo. Los pseudopéptidos para destacar en este trabajo que presentaron las características mencionadas son:  $\psi$ -38617 (INLKALAALAK<sup>d</sup>[CH<sub>2</sub>NH]RLL),  $\psi$ -38629 (INLKA<sup>d</sup>[CH<sub>2</sub>NH]LAALAKRLL) y  $\psi$ -38630 (INLK[CH<sub>2</sub>NH]ALAALAKRLL); si bien dos de ellos,  $\psi$ -38617 y  $\psi$ -38629, no mostraron actividad superior a Mastoparén MP-8 frente a las bacterias Gram positivas, su actividad es significativa si se reconoce que no son hemolíticos y mostraron ser resistentes a la proteólisis enzimática.

En cuanto a los resultados obtenidos de la hidrólisis enzimática y al realizar una comparación entre cada uno de los pseudopéptidos sintetizados con respecto al péptido nativo, se puede observar que todos los pseudopéptidos sintetizados mostraron ser más resistentes al ataque enzimático en comparación al resultado obtenido para el péptido nativo. Como se pudo observar en la tabla 4, los pseudopéptidos  $\psi$ -38612 a  $\psi$ -38623, y los pseudopéptidos  $\psi$ -38626 y  $\psi$ -38627 mostraron ser los más resistentes al ataque de enzimas presentes en el suero normal humano, lo cual sugiere que en la secuencia hay aminoácidos específicos blancos para la hidrólisis enzimática, los cuales al ser modificados específicamente en un enlace peptídico confieren a la molécula resistencia al ataque enzimático reflejándose en un aumento en el tiempo requerido para la degradación; por otro lado, se puede afirmar que la degradación del péptido MP-8 se produce hacia el extremo carboxi de la molécula, puesto que fue allí donde las modificaciones en el enlace peptídico tuvieron mayor impacto. Al poner en contacto los pseudopéptidos anteriormente mencionados frente a un ataque enzimático más fuerte, como lo es el extracto citosólico obtenido de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, se observó que en general los tiempos de degradación de los pseudopéptidos frente a estas enzimas disminuyeron; sin embargo, se puede destacar que aun frente a un ataque enzimático severo la resistencia del pseudopéptido a la degradación es alta, ya que los tiempos hallados superan en la mayoría de los casos los 240 minutos.

Basados en los resultados obtenidos por la estabilidad de los pseudopéptidos frente a las proteasas, se puede proponer que el mecanismo de acción de los pseudopéptidos es una internalización rápida a la membrana de la bacteria; de no ser así, no habría efecto antimicrobiano, ya que en la mayoría de los casos el tiempo de hidrólisis enzimática frente a enzimas de suero normal humano fue inferior a 480 minutos. Con lo cual se puede concluir que la acción del pseudopéptido sobre la membrana de las bacterias es muy corta y casi espontánea, siendo el tiempo suficiente para provocar un daño en la estructura de la membrana bacteriana, provocar su lisis y obtener actividades superiores a la del péptido nativo.

## CONCLUSIONES

De manera general se puede afirmar que una modificación realizada hacia los extremos amino y carboxi induce en Mastoparén MP-8 perfiles de actividad antibacteriana y hemolítica diferenciales y contraria a las respuestas que se obtienen cuando la modificación es realizada en la parte central de la molécula.

El estudio realizado nos permite concluir que una alteración puntual en la secuencia de Mastoparén MP-8 en el enlace peptídico y en su configuración parcial potencia la actividad antibacteriana y disminuye la actividad hemolítica del péptido nativo.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores de este artículo agradecemos al doctor Manuel Elkin Patarroyo, director de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), por permitir dar cumplimiento al desarrollo de este trabajo en las instalaciones del Instituto y financiar este proyecto. A los grupos funcionales de Química – Síntesis, estructura 3D-RMN y Biología Molecular Tuberculosis de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), por el apoyo técnico y científico.

Las cepas de *Salmonella typhimurium* ATCC las donó el profesor Eduardo Groisman del Departamento de Microbiología Molecular de Washington University, Saint Louis, MO, EE. UU. Las cepas de las bacterias Gram positivas ATCC empleadas en este estudio se obtuvieron del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia - sede Bogotá (IBUN). Y las muestras de sangre de cordero las proporcionó la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia - sede Bogotá. Agradecemos al Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.

## REFERENCIAS

1. J. Seema, S. Gopal, S. Diwan, A. Kumar, R. Kumar, S. Maiti, S. Pasha, Interaction studies of novel cell selective antimicrobial peptides with model membranes and *E. coli* ATCC 11775, *Bisht Biochimica et Biophysica Acta*, **1798**, 1864-1875 (2010).
2. M. Zasloff, Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor, *Procedures of the National Academy of Sciences, USA*, **84**, 5449-5453 (1987).
3. N.K. Brogden, K.A. Brogden, Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *International Journal of Antimicrobial Agents*, **38**, 217-225 (2011).
4. L.P. Lesmes, M.Y. Bohórquez, L.F. Carreño, M.E. Patarroyo, J.M. Lozano, A C-terminal cationic fragment derived from an arginine rich – peptide exhibits in vitro anti-bacterial and antiplasmodial activities governed by its secondary structure properties, *Peptides*, **30**, 2150-2160 (2009).
5. R.D. Yedery, C. Aranha, Antimicrobial peptides: Premises and promises, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **24**, 536-547 (2004).
6. H.G. Boman, D. Wade, I.A. Boman, B. Wihlnt, R.B. Merrifield, Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids, *Federation of European Biochemical Societies*, **259**(1), 103-106 (1989).
7. M. Egal, M. Conrad, D.L. MacDonald, W.L. Maloy, M. Motley, C.A. Genco, Antiviral effects of Synthetic membrane – active peptides on herpes simplex virus, type 1, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **13**, 57-60 (1999).
8. B. Koczulla, Current status and therapeutic potential, *Drugs Antimicrobial Peptides*, **63**, 389-406 (2003).
9. M. Ming-Liang, L. Ru-Wen, J. Zhi-Jian, Q. Wang, W. Tzong-Ming, Antimicrobial activity of synthetic all-D mastoparan, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **13**, 203-208 (2000).
10. A. Pallipes, N.B. Saidenberg, D.M. Menezes, Profiling the peptidome of the venom from the social wasp, *Journal of Proteomics*, **74**(10), 2123-2137 (2011).

11. M.A. Mendes, B.M. Souza, L.D. Santos, M.S. Palma, Structural characterization of novel chemotactic and mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes* by high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **18**, 636-642 (2004).
12. G. Guichard, J.P. Briand, M. Friede, Synthesis of arginine aldehydes for the preparation of pseudopeptides, *Peptide Research*, **6**(3), 121-124 (1993).
13. L.F. Carreño, M.P. Alba, Y. Varela, M.E. Patarroyo, J.M. Lozano, A new approach to obtaining *N*- $\alpha$ -t-Boc amino acid aldehydes from asparagine and glutamine for reduced amide pseudopeptide solid-phase synthesis, *Chemical Biology and Drug Design*, **78**, 603-611 (2011).
14. R.B. Merrifield, Solid phase synthesis the synthesis of a tetrapeptide, *Journal of the American Chemical Society*, **85**, 2149 (1963).
15. R.A. Houghten, General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Procedures of the National Academy of Sciences*, **82**, 5131-5135 (1985).
16. J.M. Lozano, L.M. Salazar, Z. Rivera, M.E. Patarroyo, What is hidden behind peptide bond restriction and  $\alpha$ - carbon asymmetry of conserved antigens? Peptide bond isosters and chirally transformed pseudopeptides as novel elements for synthetic vaccines and therapeutic agents against malaria. *Current Organic Chemistry*, **10**, 443-456 (2006).